

中蜂(*Apis indica*)王浆氨基酸的定性滤 纸层析初步研究

曾淑云 程明哲 伍金琰*

(生物系)

王浆(又称蜂乳)是工蜂咽腺(一说唾液腺)所分泌的一种半透明浓浆,由于专用以喂饲蜂王而得名。一般呈微黄色(中蜂)或乳白色(意蜂*Apis mellifera*),味甜带酸,在室温或露光情况下逐渐变色变坏,宜于真空密封在低温(0—5度)下保存。

王浆的化学成分是极其复杂的[1—14], [20], 内含旦白质、氨基酸、糖、油脂、维生素、激素、乙酰胆碱、组胺、腺嘌呤核苷二磷酸、腺嘌呤核苷三磷酸、有机酸、某些酚类、无机盐、微量元素、放射活性物质、以及尚未被发现的少量特殊物质等等。

已知王浆对蜜蜂的形态发育、生殖和寿命等方面起着决定性的作用。从药理作用和医疗性能的研究以阐明王浆的功用方面,国内外报导也不少,[15—20],据载王浆对某些心脏病和肝脏病、糖尿病、胃溃疡、关节炎、橈骨病、神经衰弱、肌肉营养不良、贫血、顽癣及毛发脱落等等均有一定的疗效;此外王浆还具有类似性激素作用和抑制细菌作用的功能[20—24]。从上述资料看来,研究王浆的化学成分及其有效成分的提制对阐明王浆的营养和医疗价值及其作用机理从而扩大利用王浆的生物学功能、促进人民健康、以及发展养蜂业、增加农村产品收入等方面都具有重要的意义。

意蜂王浆旦白质及其无旦白抽提物的氨基酸组成,过去已经有过报导[25—27],而关于中蜂王浆的氨基酸分析则未见记载,本文提出中蜂王浆旦白质氨基酸的定性滤纸层析的初步鉴定结果。

实验部分

I, 中蜂王浆的生产:一般要从蜜蜂箱中取得足够的王浆供分析研究用是有困

* 本研究由广东省广州土产出口公司供应蜂群进行王浆生产,张纪成和于丽容同志参加部分实验工作,又承蒲蛰龙教授支持并提出宝贵意见,特此致谢。

难的,由于每箱蜂所育王台(自然蜂王房)的数目极少,而且每一个王台所积存王浆的重量平均只数十毫克(中蜂)或数百毫克(意蜂),因此必须通过人工育王法才能取得较多量的王浆来源,国内人工育王生产王浆分“有王群”及“无王群”两种方法[28—32],我们采用的是后一方法[33],首先选择气候温暖、温度20—25度间、附近有蜜源、水源及大量花粉可采集的地方,另加花粉、蜜糖、鸡旦混合饲料等条件下,选择几箱哺育能力强、群势壮大的蜂群,在移虫前24小时将蜂王移开、造成蜂群有迫切需要蜂王的要求,然后用蜂蜡制造育王的王台碗,它的内径和工蜂制造的王台相同,外形截面为圆锥体,将王台碗粘附在育王框的木架上,在王台碗内放少许花粉和蜜糖的混合物或王浆,随即选择在三天内的幼虫移入王台碗中连同王台架坎入蜂箱的二框子脾中,工蜂即在人工制王台碗基础上筑起白色新蜡并开始接受喂饲即供给蜂王必需的食料王浆,这样经过72小时后,将幼虫移出,用玻璃制小匙挖出王台碗内的王浆,置消毒容器内冰箱(0—5度)保存备用。经上述过程制得的新鲜王浆含水分56.06—60.26克%。[33]

Ⅰ. 中蜂王浆干粉的制备:为了便于保存,按Townsend法[34]将上述新鲜王浆置于真空干燥器(无水 CaCl_2)中干燥,后磨碎过筛,再置于真空干燥器(P_2O_5)中干燥至恒重,所得干粉呈微黄色、富吸湿性,主要成分如下:[33](每百克干物质含克数)总旦白质26.59—39.32,还原糖30.51—38.92、总糖32.50—41.35、粗脂肪1.61—5.35、灰分2.92—3.97、磷0.46—0.70、铁微量、钙缺。本研究取用新鲜王浆[33]及保存3—5年的王浆干粉样品进行氨基酸的鉴定。

Ⅲ. 王浆样品层析前的处理:基本上按Pratt法[25],取约0.3克王浆干粉(或0.5毫升新鲜王浆)悬浮于1毫升水中,加10毫升95%乙醇以沉淀旦白质、离心、旦白质沉淀部分反复用95%乙醇洗数次直至上清液无茚三酮反应为止,合并上清液保留作游离氨基酸测定用。将制得的旦白质真空干燥(无水 CaCl_2),然后称取旦白质两份,分别以6N HCl及0.38N Ba(OH)₂,在110度下进行水解24小时,水解完毕,将酸水解液置于真空干燥器(KOH)中除尽HCl,残渣溶于10%异丙醇水溶液,是为酸水解样品,碱水解液以1.9N H_2SO_4 除去多余的 Ba^{++} 后真空干燥(KOH),残渣溶于10%异丙醇水溶液,是为碱水解样品,如此制得的酸水解及碱水解样品内含氨基酸,即可用以层析。

Ⅳ. 层析步骤:主要按陈丽筠法[35]、[36]在室温(25—28度)进行,选择厚度适中质地均一的杭州新华定性层析滤纸,裁成19×23厘米规格作单向或双向层析用。单向层析在距纸底边2厘米处点上样品,双向层析则在一角距两边各2厘米处点上样品,点子的扩散直径控制在0.5厘米左右。第一向用酸性溶剂系统:正丁醇:88%甲酸:水=15:3:2,层析3.5小时,第二向用碱性溶剂系统:正丁醇:12%氨水=13:3并以12%氨水作外用溶剂,层析7小时。层析完毕,吹去溶剂后,用0.1%茚三酮正丁醇溶液显色。依上述步骤同时进行标准氨基酸的单向及双向层析。

結 果 和 討 論

應用紙上層析實驗結果表明了用經過真空干燥且保存于真空干燥器(无水 CaCl_2) 中達3—5年的王漿干粉和用新鮮王漿^[32] 進行旦白質氨基酸的定性鑑定所得氨基酸的種類和數目完全相同, 這說明王漿干粉在保存長期間其旦白質氨基酸組成并未遭破壞。

標準氨基酸, 王漿旦白質的酸水解樣品和鹼水解樣品所得氨基酸的比移 (R_f) 數據及層析圖譜詳見表1. 圖1. 圖2. 及圖3. 根據表1 由王漿旦白質酸水解及鹼水解樣品所測得的氨基酸與相應標準氨基酸的比移值絕大多數是接近的, 個別氨基酸如色氨酸在鹼性溶劑系統中的比移值相差較大, 這可能由于濾紙的質地还不够均一所致, 層析時我們觀察到在同一時間、溫度、和層析缸下, 有些濾紙到達溶劑前沿的時間是不一致的, 但這類氨基酸可在層析圖譜上的位置和顏色的不同而加以鑑定(如色氨酸與茚三酮呈灰棕色)。

在層析圖譜上, 苯丙氨酸和亮氨酸, 甘氨酸和絲氨酸、一般不易清楚分開、也可以通過色斑顏色的不同而鑒別它們: 苯丙氨酸蘭紫、亮氨酸紫紅, 甘氨酸紫紅、絲氨酸棕紅。

酸水解一般破壞色氨酸、鹼水解破壞精氨酸、胱氨酸、蘇氨酸、組氨酸等, 故在層析圖譜上不顯出斑點。多數旦白質的絲氨酸和磷酸結合成氧-磷酸絲氨酸衍生物, 因而較難水解為游離絲氨酸, 這可能成為圖2. 不出現絲氨酸色斑的原因。

根據表1. 圖2. 及圖3. 中蜂王漿旦白質的氨基酸組成可以初步確定的有: 門冬氨酸、谷氨酸、賴氨酸、精氨酸、組氨酸、甘氨酸、絲氨酸、蘇氨酸、丙氨酸、酪氨酸、甲硫氨酸、纈氨酸、色氨酸、異亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、胱氨酸共18種, 可能還有其他種類氨基酸未被發現, 尚待進一步的研究。

上述實驗結果初步說明了中蜂王漿旦白質含有人類所不可缺少的八種必需氨基酸(賴氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、蘇氨酸、纈氨酸、甲硫氨酸、亮氨酸及異亮氨酸)。故屬於生理價值完全的旦白質, 進一步的工作將進行這八種必需氨基酸的定量測定。

表 1 氨基酸的比移 (R_f) 数据

氨基酸	标 准	氨基酸	玉 浆 蛋 白 质	酸 水 解 样 品	玉 浆 蛋 白 质	酸 水 解 样 品
	正丁醇:88%甲酸:水 15:3:2 滤纸长19厘米 层析一次	正丁醇:12%氨水 13:3 滤纸长23厘米 层析二次	正丁醇:88%甲酸:水 15:3:2 滤纸长19厘米 层析一次	正丁醇:12%氨水 13:3 滤纸长23厘米 层析二次	正丁醇:88%甲酸:水 15:3:2 滤纸长19厘米 层析一次	正丁醇:12%氨水 13:3 滤纸长23厘米 层析二次
1 門冬氨酸	0.23	0.03	0.23	0.04	0.23	0.04
2 谷氨酸	0.34	0.04	0.33	0.04	0.33	0.03
3 賴氨酸	0.15	0.15	0.15	0.14	0.15	0.14
4 精氨酸	0.12	0.18	0.12	0.17	—	—
5 組氨酸	0.12	0.22	0.11	0.22	—	—
6 絲氨酸	0.24	0.16	0.23	0.17	0.23	0.17
7 甘氨酸	0.30	0.18	—	—	0.29	0.13
8 苏氨酸	0.35	0.28	0.33	0.29	—	—
9 丙氨酸	0.44	0.28	0.45	0.29	0.44	0.29
10 酪氨酸	0.57	0.37	0.56	0.38	0.56	0.38
11 甲硫氨酸	0.64	0.56	0.62	0.57	0.64	0.57
12 賴氨酸	0.69	0.62	0.68	0.60	—	—
13 色氨酸	0.67	0.70	—	—	0.67	0.73
14 异亮氨酸	0.75	0.74	0.73	0.74	0.74	0.74
15 亮氨酸	0.76	0.78	0.76	0.79	0.75	0.80
16 苯丙氨酸	0.71	0.77	0.68	0.79	0.70	0.80
17 脯氨酸	0.48	0.42	0.47	0.42	0.47	0.42
18 胱氨酸	0.07	0.03	0.07	0.04	0.07	0.04

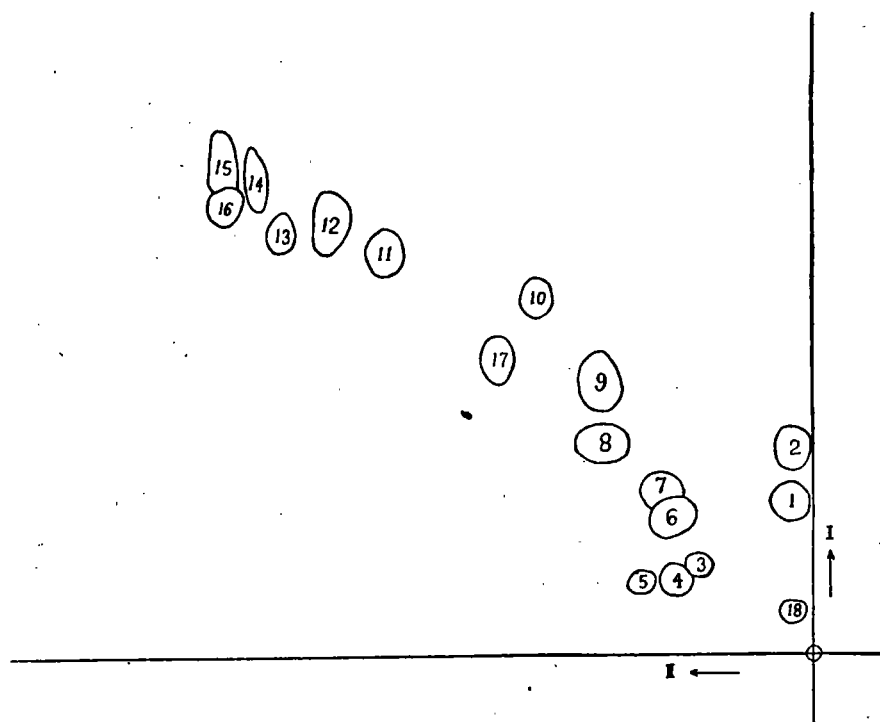


图 1. 标准氨基酸的层析图谱。

滤纸: 新华定性层析滤纸 23×19 厘米。

溶剂: 第一向 (I $\rightarrow$) 丁醇: 88% 甲醇: 水 (15:3:2), 层析一次。

第二向 (II $\rightarrow$) 正丁醇: 12% 氨水 (13:3), 层析二次。

(外用溶剂 12% 氨水)

○点样品处,

1. 天门冬氨酸 2. 谷氨酸 3. 赖氨酸 4. 精氨酸 5. 组氨酸 6. 丝氨酸 7. 甘氨酸 8. 苏氨酸 9. 丙氨酸 10. 酪氨酸 11. 甲硫氨酸 12. 缬氨酸 13. 色氨酸 14. 异亮氨酸 15. 亮氨酸 16. 苯丙氨酸 17. 脯氨酸 18. 胱氨酸

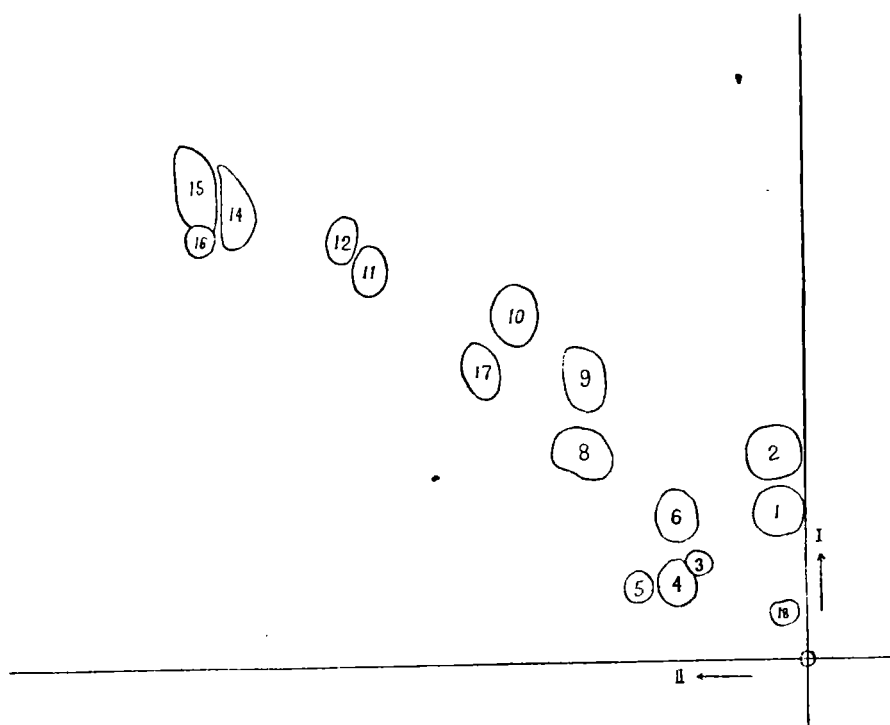


图2. 中蜂王浆蛋白质酸水解样品层析图谱。

沪纸: 新华定性层析沪纸23×19厘米。

溶剂: 第一向 (I→) 正丁醇: 88%甲酸: 水 (15:3:2) 层析一次。

第二向 (II→) 正丁醇: 12%氨水 (13:3) 层析二次。

(外用溶剂 12%氨水)

○点样品处。

1. 門冬氨酸 2. 谷氨酸 3. 賴氨酸 4. 精氨酸 5. 組氨酸 7. 甘氨酸 8. 苏氨酸
9. 丙氨酸 10. 酪氨酸 11. 甲硫氨酸 12. 纈氨酸 14. 异亮氨酸 15. 亮氨酸
16. 苯丙氨酸 17. 脯氨酸 18. 胱氨酸。

注: 图2. 中数字6应为7

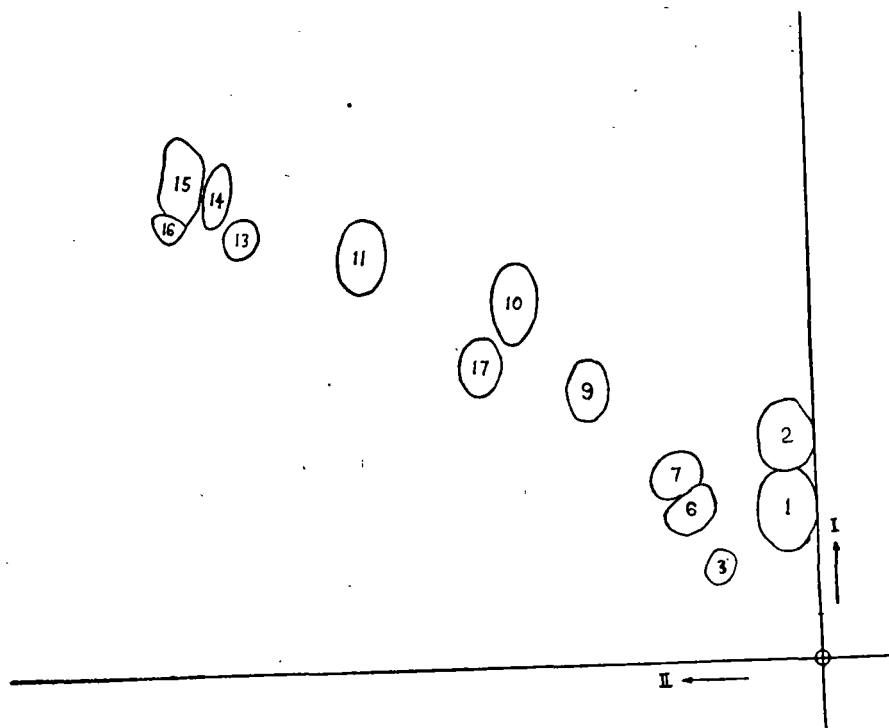


图 3. 中蜂王浆蛋白质碱水解样品层析图谱。

滤纸: 新华定性层析滤纸23×19厘米。

溶剂: 第一向(I→)正丁醇: 88%甲酸: 水(15:3:2)层析一次。

第二向(II→)正丁醇: 12% 水(13:3)层析二次。

(外用溶剂 12%氨水)

○点样品处。

1. 门冬氨酸 2. 谷氨酸 3. 赖氨酸 6. 丝氨酸 7. 甘氨酸 9. 丙氨酸 10. 酪氨酸
11. 甲硫氨酸 13. 色氨酸 14. 异亮氨酸 15. 亮氨酸 16. 苯丙氨酸 17. 脯氨酸

摘 要

1. 本文概述了王浆的化学成分, 营养价值、医疗性能以及中蜂王浆的生产过程。
2. 应用新华定性层析滤纸作纸上层析, 初步鉴定了中蜂王浆蛋白质的氨基酸组成有门冬氨酸, 谷氨酸, 赖氨酸, 精氨酸, 组氨酸, 甘氨酸, 丝氨酸, 苏氨酸, 丙氨酸, 酪氨酸, 甲硫氨酸, 缬氨酸, 色氨酸, 异亮氨酸, 亮氨酸, 苯丙氨酸, 脯氨酸, 胱氨酸共18种。

参 考 文 献

- [1] Hill, H. and Burdett, E. F. Fertility of bees and vitamin E. Nature, 1932, 130.

540.

- [2] Sebrell, W.H. and Harris, R.S, Vitamins, vol. II, 1954, 591—694.
- [3] Henschler, D. Identification of choline esters in biological material, especially acetylcholine in royal jelly of the bee. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 1956, 305, 34—41. (Ref. C. A. 50, 17210, 1956).
- [4] Buternandt, A. Active substance in the insect Kingdom. Nova Acta Leopoldina [N.S.], 1955, 17, 445—71. (Ref. C. A. 51, 7595, 1957).
- [5] Jacoli, G.G. and Poglioli, G.A. Composition and vitamins content of royal jelly produced in Emelin Romagna. Bull. soc. ital. biol. sper., 1956, 32, 3—6. Bee world, 1956, 37, 241. (Ref. C. A. 51, 3056, 1957).
- [6] Ronchetli, G. and Fargion, A. The royal jelly of *Apis mellifera*. Its composition and biological properties. Atti. soc. ital. sci. nat. e museo civico storia nat. milano., 1958, 97, 211—32. (Ref. C. A. 53, 11630, 1959).
- [7] Jacoli, G.G. and Sanquenetti, F. Adenine nucleotides in royal jelly. Congr. soc. biol. sper., fisiol. biochim., 1957, 4pp., Bee world, 1959, 40, 110. (Ref. C. A. 53, 11682, 1959).
- [8] Buternandt, A. and Rambold, H. The royal jelly of honey bee. II. Isolation of 2-amino-4-hydroxy-6-[1:2-dihydroxy-propyl-] pteridine. Z. Physiol. Chem., 1958, 311, 79—83. (Ref. C. A. 52, 15763, 1958).
- [9] Helleu, C. The presence of mesoinositol in royal jelly. Profession mid., 1956, 7/8. Bee World, 1960, 41, 110. (Ref. C. A. 54, 15736, 1960).
- [10] Barker, S.A., Foster, A.B., Lamb, D.C. and Hodgson, N. Identification of 10-hydroxy-2-decenoic acid in royal jelly. Nature, 1959, 183, 996—7.
- [11] Brown, W.H. and Freure, R.J. Some carboxylic acid in royal jelly. Can. J. Chem., 1959, 37, 2042—6.
- [12] Habowsky, J.E.T. and Shuell, R.W. Separation of the protein constituents of larval diets of the honey bee (*Apis mellifera*) by continuous paper electrophoresis. Can. J. Zool., 1959, 37, 937—64. (Ref. C. A. 54, 15723, 1960).
- [13] Barbier, M. and Lederer, E. Chemical structure of royal jelly of the queen bee (*Apis mellifera*), Compt. rend., 1960, 250, 4467—9. (Ref. C. A. 54, 23079, 1960).
- [14] Weaver, N. and Law, J.H. Heterogeneity of fatty acid from royal jelly. Nature, 1960, 188, 938—9.
- [15] 陈剑星: 漫谈“王浆”。中国养蜂, (1957, 2), 12页。
- [16] 陈剑星: 王浆的服用和简单保存方法。中国养蜂, (1957, 6), 14页。
- [17] 勃尔切夫, B. И.: 王浆的成分和它的医疗特性。中国养蜂, (1957, 10), 15页。
居 正 译。
- [18] 陈剑星: 王浆的医疗作用。中国养蜂, (1958, 8), 27页。
- [19] 北京医学院等: 王浆的医疗效果试验研究协作方案。中国养蜂, (1959, 5), 34页。
- [20] 中国农业科学院养蜂研究所: 蜜蜂, 健康之友。1959, 8页, 15—17页, 22—26页。
北京市农业科学院

- [21] Heyl, H.L. An observation suggesting the presence of a gonatropic hormones in royal jelly. *Science*, 1939, **89**, 540.
- [22] Mc Clesly, C.S. and Melampey, R.M. Bactericidal activity of royal jelly of the honey bee. *J. Bact.*, 1938, **36**, 324.
- [23] Helleu, C. Antibacterial properties of royal jelly—bactericidal and antibiotic effects. *Ann. inst. Pasteur*, 1936, **91**, 330. (Ref.C.A. **50**, 330, 1939).
- [24] 曾淑云等: 1960, 未发表工作。
- [25] J.J. Pratt, Jr. and H. L. House. A Qualitative analysis of the amino acids in royal jelly. *Science*, 1949, **110**, 9—10.
- [26] Weaver, N. and Kuiken, K.A. Qualitative analysis of the essential amino acids of royal jelly (of the honey bee) and some Pollen. *J. Econ. Entomol.*, 1951, **44**, 635—8.
- [27] Ammon, R. et al. Biochemistry of royal jelly of the honey bee. *Arzenic mittel—Forsch.*, 1957, **1**, 669—702. (Ref.C.A. **52**, 5680, 1938).
- [28] 崔元恒: 生产王漿的研究。中国养蜂, (1959, 10), 46頁。
- [29] 山西果树所王漿生产組山西果树通訊: 介紹王漿制取方法, (1960, 5) 5, 23頁。
- [30] 王彦姿: 王漿的生产、貯存和服用方法。科学大众 (1961, 5), 175頁。
- [31] 刘仰文經過三年調查研究反复試驗找到中蜂王漿高产門徑, 福建日报 1962, 4, 7, 第一版。
- [32] 刘仰文: 中蜂王漿高产的特点及其相应技术初步探討。中国农业科学 (1962, 2), 2, 4
- [33] 曾淑云, 张紀成等: 1959, 1960, 未发表工作。
- [34] Townsend, G.F. and Lucas, C.C. The Chemical nature of royal jelly. *Biochem.J.*, 1940, **34**, 1156.
- [35] 陈丽筠: 氨基酸的定量濾紙層析法, Ⅲ、一对新溶剂系統 生化学报, (1958, 3) 19—22。
- [36] 陈丽筠、王忠炎、沈昭文: 氨基酸的定量濾紙層析法。I. 純氨基酸。生理学报, (1957, 9) 21: 3, 317—323.

A preliminary investigation of the amino acids in royal jelly of the honey bee (*Apis indica*) by qualitative paper chromatography.

Tseng Shu-yun, Cheng Ming-che, Wu Gin-yian.

(Department of Biology)

Abstract

A qualitative paper chromatographic analysis of the amino acids in royal jelly of the honey bee (*Apis indica*) has been investigated.

The proteins of royal jelly from *Apis indica* were precipitated with 95% ethyl alcohol. The proteins were hydrolyzed with 0.33N Ba(OH)₂ or 6N HCl. Aliquots of the hydrolyzates were chromatographed. Aspartic acid, glutamic acid, lysine, arginine, histidine, glycine, serine, threonine, alanine, tyrosine, methionine, valine, tryptophan, isoleucine, leucine, phenylalanine, proline, and cystine were identified in the protein hydrolyzates.